

(12) **NEUE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Entscheidung über den
Einspruch:
03.03.2004 Patentblatt 2004/10

(51) Int Cl⁷: **A61K 39/385**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/CH1991/000016

(45) Hinweis auf die Patenterteilung:
15.05.1996 Patentblatt 1996/20

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 1992/003163 (05.03.1992 Gazette 1992/06)

(21) Anmeldenummer: **91901668.3**

(22) Anmeldetag: **17.01.1991**

(54) **IMPFSTOFF GEGEN DROGEN**
VACCINE AGAINST DRUGS OF ABUSE
VACCIN CONTRE LES DROGUES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(74) Vertreter: **Schweiger, Georg, Dr. et al**
Reitsstötter, Kinzebach & Partner
Postfach 86 06 49
81633 München (DE)

(30) Priorität: **22.08.1990 CH 272090**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
05.08.1992 Patentblatt 1992/32

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 311 383 EP-A- 363 041
DE-A- 2 548 196 US-A- 4 045 420

(73) Patentinhaber: **CHILKA Ltd.**
Road Town, Tortola (VG)

- **ANNALES PHARMACEUTIQUES FRANCAISES,**
Band 35, Nr. 7/8, 1977, Paris (FR); PHAM HUY
CHUONG et al., Seiten 257-264
- **K F Bonese et al (1974) Nature 252, 708-710**
- **Wainer et al (1972) Science 176, 1143-1145**
- **Kovalev et al (1980) Khim Pharm., 200-204**
(english translation)

(72) Erfinder: **CERNY, Erich Hugo**
CH-1204 Genève (CH)

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren gemaß Patentanspruch 1 und 2 zur Herstellung eines Impfstoffes gegen Drogen, welche eine Abhängigkeit erzeugen können.

[0002] Drogenabhängigkeit wird oft als eine physische und eine psychische Abhängigkeit verstanden. Die eine oder die andere Komponente kann dominieren, aber beide Komponenten finden sich normalerweise bei einem Süchtigen. Drogen welche eine physische Abhängigkeit hervorrufen sind zum Beispiel Opiate, Barbiturate, Alkohol, Zigaretten, angstlösende Medikamente und einige Sedativa. Psychologische Abhängigkeit auf der anderen Seite ist beschrieben als ein Verlangen für eine Droge, das temporär erlischt, wenn der gewünschte Effekt nach Einnahme der Droge auftritt. Beispiele für eine Droge die auch eine psychische Abhängigkeit erzeugen kann sind Opiate und Zigaretten.

[0003] Ein Therapieerfolg bedingt eine Befreiung sowohl von der psychischen als auch von der physischen Suchtkomponente. Die klassische Therapie versucht eine Entgiftung durch die sukzessive Verringerung oder in einigen Fällen (Methadon) Substituierung der Droge. Die physische Suchtkomponente wird durch ein Rehabilitierungsprogramm behandelt.

[0004] Der Impfstoff der vorliegenden Erfindung erlaubt ein neues Vorgehen zur Therapie und Prävention von Patienten, die von Drogen abhängig sind. Weiterer Gebrauch der Droge in der Gegenwart des Antikörpers nach der Impfung inaktiviert die Droge und stimuliert die Produktion von neuen spezifischen Antikörpern. Der gewünschte Drogeneffekt ist daher eliminiert und der Teufelskreis zwischen Stimulation und Applikation unterbrochen.

[0005] Der neue Impfstoff erweitert die Anwendung von Vaccinen auf das Gebiet der Drogen. Die folgenden fundamentalen Unterschiede bestehen zwischen einer klassischen Vaccine und dem vorliegenden Impfstoff: 1) der Impfstoff ist nicht gegen einen infektiösen Erreger sondern gegen eine Droge gerichtet. 2) Die typische Anwendung dieses Impfstoffes ist nicht präventiv sondern therapeutisch 3) Das Antigen gegen das der Impfstoff gerichtet ist, ist in den meisten Fällen selber nicht antigenisch sondern muss an ein Trägerprotein gebunden sein. um Antikörper hervorzurufen. 4) der Abhängigkeit erzeugende Effekt der Droge ist die Interaktion der Droge mit dem Rezeptor. Diese Interaktion ist durch das Binden des Antikörpers mit der Droge unterbunden.

[0006] Es ist daher eines der Ziele dieser Erfindung einen Impfstoff gegen Drogen zu beschreiben:

- 1) der gegen eine oder mehrere Abhängigkeit erzeugende Drogen gerichtet ist und der diese Drogen an eine Trägerprotein gebunden enthält, um die Droge immunogen zu machen.
- 2) der sowohl gegen Drogen, die eine physische, als auch gegen Drogen, die eine psychische Ab-

hängigkeit erzeugen, wirksam ist.

3) der therapeutisch (der Drogenabhängige ist geimpft um die Droge zu inaktivieren), als auch präventiv (zum Beispiel um den Fetus einer drogenabhängigen Schwangeren vor der direkten Drogenschädigung als auch späterer Abhängigkeit zu schützen), verwendet werden kann.

4) der gegen all Arten von Drogen gerichtet sein kann: zum Beispiel Opiate und Opiat-ähnliche Drogen, Marihuana, Kokain, Amphetamine, Antipsychotische Drogen, Barbiturate und andere Sedativa, psychomimetische Drogen, anticholinergische Drogen als auch Substanzen, welche diese Drogen kontaminieren.

5) der typischerweise den B-Zell Arm des Immunsystems aktiviert, der aber auch eine zusätzliche Wirksamkeit erlangen kann durch die Aktivierung des T-Zell Armes des Immunsystems oder durch einen allergenen Effekt.

6) der als ein Komplement zu einer anderen Therapieform verwendet werden kann.

Definitionen:

[0007] Drogen welche eine Abhängigkeit erzeugen koennen: Alle Substanzen, die im weitesten Sinne eine physische oder eine psychische Abhängigkeit nach einer oder mehrmaliger Anwendung hervorrufen. Eine Droge ruft eine physische Abhängigkeit hervor, wenn ein Entzugssymptom nach abruptem Entzug der Droge auftritt. Psychische Abhängigkeit auf der anderen Seite wird hervorgerufen durch eine Droge, an die sich der Abhängige gewöhnt hat und die im Süchtigen ein Verlangen nach einem bestimmten Effekt erzeugt.

[0008] Drogen, die Abhängigkeit erzeugen können sind unter anderem: Kokain und Kokainderivate (Kokain, das von Drogenabhängigen konsumiert wird enthält zusätzlich häufig Mannitol, Laktose, Nikotin, Effedrin, Kaffein, Prokain und Amphetamine), Barbiturate und andere Sedativa, Benzodiazepine, Methaqualon, Glutethimid, Chloral Hydrat, Methpyrrol, Paraldehyd und Bromide, antipsychotische Drogen, psychomimetische Drogen wie Phencyclidin oder LSD (Lysergic Acid Diethylamide), Phencyclidin und Analoga, Amphetamin und Tryptamin Derivate, Psycybin, volatile Nitrite und anticholinergische Drogen.

Komponenten von Drogen: Drogen werden nicht immer in chemisch reiner Form verwendet und sind oft mit anderen Substanzen vermischt. Es mag unter gewissen Umständen vorteilhaft sein, den Impfstoff gegen mehrere Substanzen gleichzeitig zu richten um einen breiteren Schutzeffekt zu erhalten.

Vaccine: Eine Präparation, bestehend aus einem Immunogen, welche den B-Zell Arm und eventuell auch den T-Zell Arm des Immunsystems zu aktivieren vermag. Das Immunogen des Impfstoffes dieser Erfindung ist typischerweise eine Droge, welche als Hapten an eine Trägersubstanz gebunden ist. Die Bindung zwischen

Hapten und Träger kann kovalent oder ionisch sein oder auf Van der Waals oder Wasserstoff Brücken beruhen. Die Bindung kann aber auch ein oder mehrere Atome als Brücke enthalten. Eine Droge kann auch immunogen gemacht werden durch einfaches chemisches Vernetzen der Droge (zum Beispiel mit Glutaraldehyd) um ein Molekulargewicht über 5000 Dalton zu erhalten. In diesem Fällen kann auf eine Trägersubstanz verzichtet werden.

[0009] Der Fabrikationsprozess der Vaccine enthaltet typischerweise zwei Schritte: 1) Konjugation: Die Droge wird an die Trägersubstanz gebunden 2) Purifikation: das Hapten-Trägersubstanz Konjugat wird von Beiprodukten des Kuppelungsprozesses gereinigt und in eine physiologische Lösung gegeben. Die Konjugation kann in organische Lösungsmittel oder in wässrigem Milieu erfolgen. Häufig verwendete Kuppelungssubstanzen sind: Karbodiimide, Imidoester, N-Hydroxysuccinimid Ester oder ihre wasserlöslichen Sulfo-Derivate, Maleimid-Derivate und Phenyl Azide.

Die Purifikation erfolgt üblicherweise durch eine Dialyse oder mit Hilfe von Gel oder Ionen Chromatographie. Das Hapten-Trägersubstanz Konjugat hat meistens ein Molekulargewicht über 100 000 Dalton und kann daher leicht von den Verunreinigungen wie zum Beispiel Überschuss der Kuppelungssubstanz gereinigt werden, die typischerweise ein Molekulargewicht unter 500 Dalton haben. Bevorzugte Trennmethode sind extensive Dialyse in einem Dialyseschlauch mit einer wässrigen Lösung, beispielsweise mehrmaliger Puffer Wechsel mit Phosphate gepufferter Saline (PBS) oder Chromatographie über eine Sephadex G 25 Kolonne (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Schweden). Sterilfiltration mit einem Filter von 0,2 micrometer und Entfernung von pyrogenem Material sind die Endschritte der Purifikation.

Vaccine für präventive Zwecke:

[0010] Die Person, die geimpft werden soll ist noch nicht drogenabhängig. Eine Person geeignet für eine präventive Impfung wäre zum Beispiel ein Säugling, der die Droge über die Muttermilch einnimmt.

Vaccine für therapeutische Zwecke:

[0011] Die Person, die geimpft werden soll ist bereits drogenabhängig oder hat begonnen die Droge zu verwenden. Eine Person geeignet für die Impfung ist beispielsweise ein Morphin Süchtiger, der eine Entziehungskur untergehen will.

Immunisierung gegen Drogen: Bei Patienten, die an Vergiftungserscheinungen einer Droge leiden, bleibt keine Zeit um Antikörper durch eine Vaccine zu erzeugen. Solchen Fällen kann durch direkte Applikation von spezifischen humanen oder tierischen Antikörpern geholfen werden. Der spezifische Antikörper bindet sich nach Applikation in kurzer Zeit an die noch ungebunde-

ne Droge und die Immunkomplexe werden durch das retikulo-endotheliale System eliminiert. Dadurch wird der Körper entgiftet. Es besteht die Möglichkeit eine Mischung von Antikörpern gegen mehrere Drogen zu verwenden, da in vielen Fällen nicht klar ist, mit welcher Droge sich der Patient vergiftet hat.

Antikörper: Eine Klasse von Plasmaproteinen, die durch die B-Zellen des Immunsystems nach Stimulation durch ein Antigen erzeugt werden. Humane Antikörper sind Immunglobuline der Ig G, M, A, E oder D Gruppe. Antigene: Eine Substanz, die fähig ist, eine Immunantwort hervorzurufen. Die Antigene sind typischerweise Proteine, aber sie können auch Zucker und Lipidgruppen enthalten. Antigene haben typischerweise ein Molekulargewicht über 10 000 Dalton.

Haptene: Dies sind kleine Moleküle, die für sich selbst nicht Antikörper hervorrufen können. Um antigenisch zu werden muss ein Hapten an einen Träger gebunden werden. Die Immunantwort gegen ein Hapten kann gegen das Hapten gerichtet sein, gegen den Träger oder gegen beide Substanzen. Das Hapten der vorliegenden Erfindung ist normalerweise eine Droge, ein Metabolit der Droge oder ein Bestandteil einer Droge wie zum Beispiel eine Komponente von Zigarettenrauch.

Einige Drogen sind schnell metabolisiert nach Aufnahme durch den Körper. Morphin zum Beispiel ist schnell in Morphin-3-Glucuronat und Morphin-6-Glucuronat umgewandelt. Es mag daher in gewissen Fällen von Vorteil sein, wenn Metaboliten als Hapten verwendet werden an Stelle der ursprünglichen Droge.

Trägersubstanz: Das Problem Antikörper gegen ein kleines Molekül (Hapten) hervorzurufen wird dadurch gelöst, dass das kleine Molekül an einen Träger gebunden wird. Diese Bindung macht das Hapten immunogen, das heißt es werden nach Injektion in den Körper Antikörper hervorgehen. Die Bindung des Haptens an das Trägerprotein ist oft kovalent, kann aber auch ionisch sein oder über eine chemische Komponente erfolgen, die als Brücke zwischen Hapten und Trägersubstanz dient. Die Trägersubstanz ist typischerweise ein Protein, kann aber auch Zucker und Lipide in mono- oder polymerer Form enthalten. Unter besonderen Umständen ist es auch möglich das Hapten zu vernetzen so dass das Hapten keine Trägersubstanz mehr benötigt um immunogen zu werden.

Antigen/ Antikörper Interaktion: Die Kombination von einem spezifischen Antikörper mit der Oberflächen Determinante von einem korrespondierenden Antigen (= Hapten plus Trägersubstanz) ist reversibel und der Komplex kann dissoziieren in Abhängigkeit von der Bindungsstärke. Dadurch dass die beiden Partner eine komplementäre Form der Elektronenwolken an der Oberfläche haben (ähnlich wie ein Schlüssel mit dem Schloss) gibt es eine Interaktion, welche durch die Wasserstoffbrücken, die Van der Waals Kraft, die elektrostatische Kraft und die hydrophobe Interaktion determiniert ist.

Adjuvans: Dies ist eine Substanz oder Mischung von

Substanzen, die zur Vaccine dazugegeben werden um die Effizienz der Antikörperbildung zu erhöhen oder um sicherzustellen, dass eine bestimmte Klasse von Antikörpern wie IgM Immunglobuline oder Komplement bindende Antikörper erzeugt werden. Substanzen welche als Adjuvantien gebraucht werden, sind beispielsweise Mineralöle, Derivate von Aluminium oder Bestandteile von Mykobakterien. Die Vaccinen dieser Erfindung können mit oder ohne Adjuvantien verwendet werden.

Applikationsarten: Die Vaccine kann intravenös, intramuskulär, subkutan, oder intradermal injiziert werden. Sie kann aber auch oral (z. B. Kapsel, die gegen Verdauung im Magen und Dünndarm schützt) verabreicht werden. Die Vaccine kann ebenfalls in bestimmten Fällen als Aerosol gegeben werden oder auf der Haut zur perkutanen Resorption verabreicht werden. Die Vaccine kann einmal oder mehrere Male verabreicht werden.

[0012] Um das Verständnis der Erfindung noch zu verbessern, sind folgende Beispiele angegeben.

Beispiel 1:

[0013] Dieses Beispiel zeigt am Mausmodell wie nach Impfung Antikörper gegen Morphinderivate oder Barbiturate erzeugt werden und die Droge nach Injektion in einer kürzeren Zeit aus dem Kreislauf entfernt wird.

Hapten-Trägersubstanz Konjugation:

[0014] Die Methode von Wainer wird verwendet um das Morphin-6-Hemisuccinat zu synthetisieren und an Bovines Serum Albumin (BSA) zu binden (Wainer B.H. et al., 1972, Science 176, 1143-45, Wainer B. H. et al., 1972, Science 178, 847-8). Eine andere Präparation wird zubereitet indem Morphin zu 3-o-Karboxymethylmorphin umgewandelt wird durch Reaktion der freien Base mit Natrium-beta-Chlorazetat in absolutem Alkohol. Karboxymethylmorphin (8 mg) wird dann in 2 ml von destilliertem Wasser welches 10 mg BSA enthält aufgelöst und 8 mg von 1-Athyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Karbodilimid werden dazugegeben nach Adjustieren des pH der Lösung auf 6. Die Mischung wird nach Inkubation in Raumtemperatur über Nacht intensiv gegen PBS, pH 7.6 dialysiert.

[0015] Die folgende Methode wird verwendet um Barbiturat - Keyhol Lymphet Hemocyanin (KLH, Sigma, St. Louis, USA) Konjugate für die Vaccine zu erhalten: 5-allyl-5-(1-karboxyisopropyl)barbitursäure wird umgewandelt zu 5-allyl-5-(1-p-nitrophenyloxykarbonylisopropyl)barbitursäure durch Reaktion von 10 mg von der freien Base mit p-Nitrophenol (12 mg) in einer N,N-Dimethylformamid Lösung während 24 Stunden bei 4° C. Die Kupplung an KLH (19 mg) wird dann in einer Lösung ausgeführt: die gleiche Volumina von Glycerin und Wasser und 10 mg Dicyclohexylkarbodilimid enthält. Die Mischung ist nach 24 stündiger Inkubation bei 4° C mit mehrmaligem Pufferwechsel gegen PBS pH 7.6 dialy-

ziert. Der Substitutionsgrad der Droge an der Trägersubstanz wird berechnet als ein Ansteigen der Absorption vom Konjugat bei 202 nm verglichen mit einer KLH Kontrolllösung (molarer Extinktionskoeffizient der Barbiturate = 19500).

[0016] Immunisation: 5 weibliche Balb/C Mäuse werden subkutan 8 mal in 2 wöchigen Intervallen mit 40 Mikrogramm des Morphin-BSA Konjugates per Maus und Dose injiziert. Eine weitere Gruppe von 5 weiblichen Balb/C Mäusen erhält das Barbiturat-KLH Konjugat unter den gleichen Bedingungen, und eine Kontrollgruppe von 10 gleichaltrigen weiblichen Balb/C Mäusen wird unter den gleichen Konditionen mit dem Puffer des Impfstoffes ohne Vaccine behandelt.

Blutproben: Die Blutproben werden von der Schwanzvene entnommen.

[0017] Messung des Drogengehaltes: Die High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) Methode von Joel et al. (1988, Chromatography, 430: 394-9 wird als Referenzmethode verwendet um Morphin, Morphin-6-Glucuronid und Morphin-3-Glucuronid zu messen. Die Morphine, als auch die Barbiturate werden auch mit einem kommerziellen Enzyme Multiplikation Immunoassay (EMIT, Syva Corp., Palo Alto, USA) in Übereinstimmung mit der Gebrauchsanweisung (EMIT operator's manual, Shiva Corporation, Palo Alto, USA) bestimmt. Es ist für die Evaluierung der Vaccine wichtig, freie Droge von Antikörper gebundener Droge zu differenzieren: der EMIT Test wird daher folgendermaßen modifiziert: die verdünnte Serumprobe wird vor Durchführung des EMIT Testes von Antikörpern gereinigt, durch eine zwei stündige Inkubation bei Zimmer Temperatur in einem PBS Puffer, pH 7.6, der CnBr-aktivierte Sepharose 4 B enthält, an welche polyklonale Kaninchenantikörper gegen humane leichte Ketten der Immunglobuline gebunden sind (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Schweden).

[0018] Fünf Mäuse, die geimpft wurden und fünf Mäuse der Kontrollgruppe werden 2 Wochen nach der letzten Immunisation mit 0.5 mg Morphin pro Maus injiziert. Die Serumproben werden unmittelbar nach der Injektion und 2 Stunden nach der Injektion entnommen und die Menge der Droge im Serum wird mit Hilfe des modifizierten EMIT Testes bestimmt. Die Droge kann in den Proben, die gerade nach Injektion der Droge entnommen wurden noch festgestellt werden, ist aber 2 Stunden nach Injektion nicht mehr feststellbar. Die Diskrimination im Testsystem zwischen positiver und negativer Probe wird sowohl für die Barbiturate als auch Morphin auf 5 ng/ml festgelegt. Die Interpretation der Testresultate ist, dass nach erfolgreicher Impfung, sich die spezifischen Antikörper an die Droge gebunden haben und die freie Droge daher nicht mehr feststellbar ist.

Beispiel 2:

[0019] Dieses Experiment demonstriert, dass die "Immunität" gegen die Droge auch nach Monaten noch vorhanden ist. Zwei der immunisierten Mäuse von Beispiel 1 und drei Mäuse der Kontrollgruppe werden 2 und 4 Monate nach dem ersten Experiment mit 0,5 mg Morphin injiziert. Eine Blutprobe wird wie im ersten Experiment unmittelbar nach der Injektion und 2 Stunden nach der Injektion entnommen und das Serum wird im EMIT Test für Morphin getestet.

[0020] Das Serum der Mäuse, welche vorher mit dem Morphin-BSA Konjugat getestet wurden, ist wieder negativ und nur die Proben, die unmittelbar nach der Injektion entnommen werden, zeigen ein positives Resultat. Die Kontrollgruppe zeigt in allen Untersuchungen erkennbare Spuren von Morphin. Es wird der Schluss gezogen, dass die Vaccine über längere Zeit wirksam ist.

Beispiel 3:

[0021] Dieses Beispiel dient dazu, die Schutzwirkung der spezifischen Antikörper, respektive des spezifischen Immunserums welches die Antikörper enthält, zu zeigen.

[0022] Jeweils zwei Mäuse der Kontrollgruppe erhalten 0,5 mg Morphin (Maus A und B) und 0,5 mg Phenobarbital (Maus C und D). Maus A und C erhalten jeweils 0,5 ml des Serums der Mäuse welche vorher mit dem Anti-Morphin Impfstoff geimpft wurden und Maus B und D erhalten 0,5 ml des Serums der Mäuse welche vorher mit dem Anti-Barbiturat Impfstoff geimpft wurden. Zwei Stunden nach der Injektion des Immunserums werden Blutproben entnommen und für die Gegenwart der Drogen untersucht (modifizierter EMIT Test). Die Maus welche Morphin und anti-Morphin Serum bekommen hat, zeigt keine freie Droge im Test. Die Maus welche Morphin und anti-Barbiturat Serum bekommen hat, zeigt freies Morphin im Serum. Das analoge Phänomen zeigt sich bei den Mäusen welche Phenobarbital erhalten haben: bei der Maus welche das spezifische Immunserum erhalten hat lässt sich keine freie Droge mehr nachweisen (Maus D). Die Maus mit dem Anti-Morphin Serum (Maus C) zeigt immer noch Spuren des Barbiturales im Serum.

[0023] Dieses Experiment kann auch mit Antiserum durchgeführt werden, dass aus monoklonalen Antikörpern oder einer Mischung von monoklonalen Antikörpern gegen die Drogen besteht: es wird ein analoges Resultat erwartet.

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung eines therapeutisch und/oder präventiv verwendbaren Impfstoffs gegen wenigstens eine Abhängigkeit erzeugende Droge, wobei man

a) eine oder mehrere Drogen als Hapten mit einer Trägersubstanz konjugiert, um das Hapten antigenisch zu machen;

b) das Produkt aus Stufe a) gegebenenfalls reinigt; und

c) zu einem Impfstoff formuliert, welcher nach Impfung eines Patienten bewirkt, dass bei weiterem Gebrauch der Droge in Gegenwart von Drogenspezifischen Antikörpern die Droge inaktiviert wird und neue Drogenspezifische Antikörper produziert werden; wobei der Impfstoff den Drogeneffekt im Patienten eliminiert und damit den Kausalzusammenhang zwischen Drogenstimulation und Drogenapplikation unterbricht; und wobei der durch die Impfung erzielte, die Drogenwirkung eliminierende Effekt einem Effekt entspricht, der durch achtmalige subkutane Gabe von 40 µg eines Morphin-BSA- oder Barbiturat-KLH-Konjugates in zweiwöchigen Intervallen in Balb/C-Mäusen induzierbar ist.

- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Droge, welche eine Abhängigkeit erzeugt, zu einer der folgenden Gruppen gehört: Opiate, Marihuana, Amphetamine, Kokain, Barbiturate, Sedativa, Methaqualon, Benzodiazepine, Lysergsäure Diethylamid, psychomimetische Drogen, Nikotin, anticholinergische Drogen und antipsychotische Drogen.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Trägersubstanz eine oder mehrere der folgenden chemischen Bestandteile enthält: Proteine, Glycoproteine, Polysaccharide, Liposaccharide, Lipoproteine, Metalle.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bindung zwischen der Droge, welche eine Abhängigkeit erzeugt und dem Hapten durch eine Brückensubstanz erfolgt.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** man den Impfstoff zusammen mit einem Adjuvans formuliert, um den immunogenen Effekt des Impfstoffs zu verstärken.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** man den Impfstoff durch Sterilfiltration in eine physiologisch verträgliche Form bringt.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** man eine wässrige Lösung verwendet, deren pH-Wert mit einem Puffer zwischen 5,5 und 8 eingestellt worden ist.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Impfstoff nach Bindung des

Haptens an die Trägersubstanz dialysiert wird, um Beiprodukte der Herstellung zu entfernen.

Claims

- Method of producing a vaccine for therapeutic and/or preventative use against at least one dependency-creating drug, wherein

a) one or more drugs is conjugated as a hapten to a carrier substance in order to render the hapten antigenic;

b) the product from step a) is optionally purified; and

c) is formulated as a vaccine, which after vaccination of a patient causes, if the drug is further used, said drug to be inactivated in the presence of drug-specific antibodies and new drug-specific antibodies to be produced; whereby the vaccine eliminates the effect of the drug in the patient and thereby breaks the causal connection between the stimulation by the drug and its administration; and whereby the effect of eliminating the action of the drug which is achieved by means of the vaccination corresponds to an effect inducible by subcutaneous administration of 40 µg of a morphine/BSA or barbiturate/KLH conjugate eight times at two-weekly intervals in Balb/C mice.

- Method according to claim 1, **characterised in that** the drug which creates a dependency belongs to one of the following groups: opiates, marijuana, amphetamines, cocaine, barbiturates, sedatives, methaqualone, benzodiazepines, lysergic acid diethylamide, psychomimetic drugs, nicotine, anticholinergic drugs and antipsychotic drugs.

- Method according to claim 1, **characterised in that** the carrier substance contains one or more of the following chemical components: proteins, glycoproteins, polysaccharides, liposaccharides, lipoproteins, metals.

- Method according to claim 1, **characterised in that** the binding between the drug which creates a dependency and the hapten is via a bridging substance.

- Method according to claim 1, **characterised in that** the vaccine is formulated together with an adjuvant in order to intensify the immunogenic effect of the vaccine.

- Method according to claim 1, **characterised in that** the vaccine is brought into a physiologically acceptable form by sterile filtration.

- Method according to claim 1, **characterised in that** an aqueous solution is used, the pH of which has been adjusted to between 5.5 and 8 using a buffer.

- Method according to claim 1, **characterised in that** after binding of the hapten to the carrier substance the vaccine is dialysed in order to eliminate by-products of the manufacturing process.

Revelations

- Procédé de préparation de vaccins utilisables en thérapie ou en prévention contre au moins une drogue engendrant une dépendance, suivant lequel :

a) on conjugue une ou plusieurs drogues en tant que haptène avec une substance porteuse pour rendre l'haptène antigénique,

b) on purifie le cas échéant le produit de l'étape a),

c) et on en fait une formulation de vaccin qui, après vaccination d'un patient, a pour effet, lors d'une poursuite de la consommation de drogue, d'inactiver la drogue en présence d'anticorps spécifiques de la drogue et de produire de nouveaux anticorps spécifiques de la drogue, le vaccin éliminant ainsi l'effet de la drogue chez le patient et interrompant la relation de cause à effet entre stimulation de drogue et application de drogue, et l'effet d'élimination de l'activité de la drogue obtenu par la vaccination impliquant un effet s'induisant par une administration sous-cutanée de 40 microgrammes d'un conjugué morphine-BSA ou barbiturate-KLH répétée huit fois par intervalles de deux semaines.

- Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** la drogue engendrant une dépendance relève de l'un des groupes suivants : opiacés, marijuana, amphétamines, cocaïne, barbituriques, sédatifs, méthqualone, benzodiazépine, acide lysergique diéthylamide, drogues psychomimétiques, nicotine, drogues anticholinergiques et drogues antipsychotiques.

- Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** la substance porteuse comporte un ou plusieurs des constituants chimiques suivants : protéines, glycoprotéines, polysaccharides, liposaccharides, lipoprotéines, métaux.

- Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** la liaison entre la drogue engendrant une dépendance et l'haptène est par l'intermédiaire

d'une substance formant pont.

5. Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** le vaccin est formulé avec addition d'un adjuvant de manière à renforcer l'effet immunogène du vaccin. 5
6. Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'on met le vaccin sous forme physiologiquement compatible par filtration stérile. 10
7. Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** l'on utilise une solution aqueuse dont le pH est fixé entre 5,5 et 8 par un tampon. 15
8. Procédé suivant la revendication 1, **caractérisé en ce que** le vaccin est soumis à dialyse une fois l'hap-tène lié à la substance porteuse, afin de le débarrasser des sous-produits de la fabrication. 20

25

30

35

40

45

50

55

Cerny translation

5
VACCINE AND IMMUNOSERUM AGAINST DRUGS OF ABUSE10
Abstract

Addictive drugs like cocaine, heroin or amphetamines are spreading in an epidemic manner in the western world and are an important factor in the spread of the acquired immune deficiency syndrome AIDS (multiple use of infected needles among drug addicts). The present invention describes a vaccine and immunoserum against drugs. The vaccine contains the drugs bound to a carrier protein in order to produce antibodies against the drugs in the affected person. The use of the drug in the presence of the antibodies deactivates the drug. The desired drug effect is thus eliminated and the vicious circle between stimulation and application is broken.

15
* * * * *

The invention relates to a process according to claims 1 and 2 for the production of a vaccine against drugs that can cause dependence. The invention also describes a process according to claim 10 for the production of antibodies against drugs that can cause dependence. These antibodies can be used for detoxifying drug addicts who have taken an overdose of the drug.

25 Drug dependence is often understood to be a physical and a psychological dependence. One or other of the components can dominate, but both components are normally found in an addict. Drugs which can cause physical dependence are, for example, opiates, barbiturates, alcohol, cigarettes, anxiolytic medicines and some sedatives. Psychological dependence, on the other hand, is described as a craving for a drug which temporarily disappears when the desired effect occurs after taking the drug. Examples of drugs which can also cause psychological dependence are opiates
30 and cigarettes.

A therapeutic response causes liberation from both the psychological and the physical component of addiction. Traditional therapy tries to detoxify through a successive reduction in, or in some cases (methadone) substitution of, the drug. The physical
35 component of addiction is treated by a rehabilitation programme.

The vaccine of the present invention permits a new procedure for the treatment and prevention of patients who are dependent on drugs. Further use of the drug in the presence of the antibody following vaccination inactivates the drug and stimulates the production of new specific antibodies. The desired effect of the drug is therefore eliminated and the vicious circle between stimulation and administration is broken.

The new vaccine expands the use of vaccines to the field of drugs of abuse. The following fundamental differences exist between a traditional vaccine and the present vaccine: 1) the vaccine is directed not at an infectious pathogen but at a drug. 2) The typical use of this vaccine is not preventive but therapeutic. 3) The antigen at which the vaccine is directed is in most cases not antigenic itself but must be bound to a carrier protein to produce antibodies. 4) The dependence-producing effect of the drug is the interaction between the drug and the receptor. This interaction is prevented by the binding of the antibody to the drug.

15

It is therefore one of the aims of this invention to describe a vaccine against drugs of abuse:

- 1) which is directed at one or more dependence-producing drugs and which contains these drugs bound to a carrier protein to make the drug immunogenic.
- 20 2) which is effective both against drugs which cause physical dependence and against drugs which cause psychological dependence.
- 3) which can be used therapeutically (the drug-dependent individual is vaccinated to inactivate the drug) and preventively (for example, to protect the foetus of a drug-dependent pregnant woman against direct damage from the drug and subsequent dependence.
- 25 4) which can be directed at all types of drugs: for example, opiates and opioid drugs, marijuana, cocaine, amphetamines, antipsychotic drugs, barbiturates and other sedatives, psychomimetic drugs, anticholinergic drugs as well as substances which contaminate these drugs.

- 30 5) which typically activates the B cell arm of the immune system, but which can also acquire additional efficacy by activation of the T cell arm of the immune system or by an allergenic effect.

- 6) which can be used as a complement to another form of therapy.

Definitions:

Drugs which can cause dependence: All substances which in the widest sense cause physical or psychological dependence after single or repeated use. A drug causes physical dependence when a withdrawal symptom occurs after sudden withdrawal of the drug. Psychological dependence, on the other hand, is caused by a drug to which the addict has become accustomed and which produces a craving in the addict for a specific effect.

Drugs which can cause dependence are, *inter alia*: cocaine and cocaine derivatives (cocaine consumed by drug addicts often also contains mannitol, lactose, nicotine, ephedrine, caffeine, procaine and amphetamines), barbiturates and other sedatives, benzodiazepines, methaqualone, glutethimide, chloral hydrate, methyprylon, paraldehyde and bromides, antipsychotic drugs, psychomimetic drugs and phenylcyclidine or LSD (lysergic acid diethylamide), phenylcyclidine and analogues, amphetamine and tryptamine derivatives, psilocybin, volatile nitrites and anticholinergic drugs.

Components of drugs: Drugs are not always used in chemically pure form and are often mixed with other substances. Under certain circumstances it may be advantageous to direct the vaccine at several substances simultaneously to obtain a broader protective effect.

Vaccine: A preparation comprising an immunogen which is capable of activating the B cell arm and possibly also the T cell arm of the immune system. The immunogen of the vaccine of this invention is typically a drug which is bound to a carrier substance as a hapten. The bond between hapten and carrier can be covalent or ionic or be based on van der Waals [force] or hydrogen bridges. The bond can, however, also contain one or more atoms as a bridge. A drug can also be rendered immunogenic by simple chemical cross-linking of the drug (for example with glutaraldehyde) in order to obtain a molecular weight over 5000 dalton. In such cases the need for a carrier can be dispensed with.

The manufacturing process for the vaccine typically comprises two steps: 1) Conjugation: the drug is bound to the carrier. 2) Purification: the hapten carrier

conjugate is purified of by-products from the coupling process and added to a physiological solution. Conjugation can take place in organic solvents or in an aqueous environment. Commonly used coupling substances are: carbodiimides, imido esters, N-hydroxysuccinimide esters or their water-soluble sulpho derivatives, maleimide derivatives and phenyl azides.

Purification is usually performed by dialysis or with the aid of gel or ion chromatography. The hapten carrier conjugate usually has a molecular weight over 100,000 dalton and can therefore easily be purified of the impurities, e.g. excess coupling substance, which typically have a molecular weight of less than 500 dalton. Preferred separation methods are extensive dialysis in a dialysis tube with an aqueous solution, for example repeated buffer change with phosphate-buffered saline (PBS), or chromatography over a Sephadex G 25 column (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Sweden). Sterile filtration with a 0.2 micrometre filter and removal of pyrogenic material are the final steps of purification.

Vaccine for preventive purposes:

The person to be vaccinated is not yet dependent on drugs. A person suitable for preventive vaccination would be, for example, an infant which is ingesting the drug via breast milk.

Vaccine for therapeutic purposes:

The person to be vaccinated is already dependent on drugs or has started to use the drug. A person suitable for vaccination is, for example, a morphine addict who is wanting to undergo detoxification.

Immunisation against drugs of abuse: In patients suffering from symptoms of drug poisoning there is no time to produce antibodies by means of a vaccine. Such cases can be helped by direct administration of specific human or animal antibodies. Following administration, the specific antibody binds within a short period of time to the still unbound drug and the immunocomplexes are eliminated by the reticulo-endothelial system. The body is thereby detoxified. The possibility exists of using a mixture of antibodies to several drugs, as in many cases it is not clear with which drug the patient has poisoned himself.

The antibodies which are used can be monoclonal or polyclonal antibodies. Monoclonal antibodies are produced *in vitro* by fusion of a B cell containing the genetic information for the specific immunoglobulin, with a B cell line. The resultant hybrid cell line now secretes antibodies of the desired specificity. The possibility also exists of obtaining monoclonal antibodies by transformation of a B cell into a B cell line using an Epstein-Barr virus infection of the B cell.

The antibodies can also be administered by the oral route as patients exhibiting symptoms of an overdose have often not fully absorbed drugs that are taken orally.

10 The antibodies are in such cases to be administered in a capsule which protects them from digestion in the gut and small intestine.

Antibodies: A class of plasma proteins that are produced by the B cells of the immune system following stimulation by an antigen. Human antibodies are immunoglobulins of the Ig G, M, A, E or D group.

Antigens: A substance that is capable of producing an immune response. Antigens are typically proteins, but they can also contain sugar and lipid groups. Antigens typically have a molecular weight over 10,000 dalton.

20 Haptens: These are small molecules which in themselves are unable to produce antibodies. In order to become antigenic, a hapten must be bound to a carrier. The immune response to a hapten can be directed at the hapten, at the carrier or at both substances. The hapten of the present invention is normally a drug, a metabolite of the drug or a component of the drug, for example a component of cigarette smoke.

25 Some drugs are metabolised rapidly following absorption by the body. Morphine, for example, is swiftly converted to morphine 3-glucuronate and morphine 6-glucuronate. In certain cases it may therefore be advantageous if metabolites are used as hapten in place of the original drug.

30 Carrier: The problem of producing antibodies to a small molecule (hapten) is solved by the small molecule being bound to a carrier. This bond makes the hapten immunogenic, i.e. antibodies are produced following injection into the body. Binding of the hapten to the carrier protein is often covalent, but may also be ionic or be

performed by a chemical component serving as a bridge between hapten and carrier. The carrier is typically a protein, but can also contain sugar and lipids in monomeric or polymeric form. Under special circumstances it is also possible to cross-link the hapten, so that the hapten no longer requires a carrier to become immunogenic.

5

Antigen/antibody interaction: The combination of a specific antibody with the surface determinant of a corresponding antigen (= hapten plus carrier) is reversible and the complex can dissociate depending on the strength of the bond. Due to both partners having a complementary shape of the electron clouds on their surface (similar to a key with the lock) there is an interaction, which is determined by hydrogen bridges, van der Waals force, electrostatic force and hydrophobic interaction.

10

Adjuvant: This is a substance or mixture of substances which are added to the vaccine to increase the efficiency of antibody formation or to ensure that a certain class of antibodies, such as IgM immunoglobulins or complement-binding antibodies, is produced. Substances which are used as adjuvants are, for example, mineral oils, derivatives of aluminium or components of mycobacteria. The vaccines of this invention can be used with or without adjuvants.

15

20 Methods of administration: The vaccine can be injected by the intravenous, intramuscular, subcutaneous or intradermal route. However, it can also be administered by the oral route (e.g. capsule which protects against digestion in the gut and small intestine). The vaccine can in certain cases also be given as an aerosol or be applied to the skin for percutaneous absorption. The vaccine can be administered once or several times.

25

The following examples are given to further improve understanding of the invention.

Example 1:

30

This example shows in a mouse model how antibodies to morphine derivatives or barbiturates are produced following vaccination and how the drug is removed from the circulation within a short period of time following injection.

Hapten carrier conjugation:

Wainer's method is used to synthesise morphine 6-hemisuccinate and bind it to bovine serum albumin (BSA) (Wainer B.H. et al., 1972, Science 176, 1143-45; Wainer B.H. et al., 1972, Science 178, 647-8). Another preparation is prepared by
5 converting morphine to 3-O-carboxymethylmorphine by reacting the free base with sodium beta-chloroacetate in absolute alcohol. Carboxymethylmorphine (8 mg) is then dissolved in 2 ml of distilled water containing 10 mg BSA, and 8 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide is added after adjusting the pH of the solution to 6. Following incubation at room temperature overnight, the mixture is
10 extensively dialysed against PBS, pH 7.6.

The following method is used to produce barbiturate-keyhole limpet hemocyanin (KLH, Sigma, St Louis, USA) conjugates for the vaccine: 5-allyl-5-(1-carboxy-isopropyl)barbituric acid is converted to 5-allyl-5-(1-p-nitrophenyloxycarbonyl-isopropyl)barbituric acid by reacting 10 mg of the free base with p-nitrophenol
15 (12 mg) in an N,N-dimethylformamide solution for 24 hours at 4°C. Coupling to KLH (19 mg) is then performed in a solution containing equal volumes of glycerin and water and 10 mg dicyclohexylcarbodiimide. Following incubation for 24 hours at 4°C the mixture is dialysed against PBS at pH 7.6 with repeated change of buffer. The
20 degree of substitution of the drug on the carrier is calculated as an increase in absorption by the conjugate at 202 nm compared with a KLH control solution (molar extinction coefficient of barbiturates = 19500).

Immunisation: Five female BALB/c mice are injected subcutaneously eight times at
25 2-week intervals with 40 micrograms of the morphine-BSA conjugate per mouse per dose. A further group of 5 female BALB/c mice are given the barbiturate-KLH conjugate under the same conditions, and a control group of 10 female BALB/c mice of the same age is treated under the same conditions with the vaccine buffer without vaccine.

30

Blood samples: The blood samples are taken from the tail vein.

Measurement of drug content: The high-pressure liquid chromatography (HPLC) method of Joel et al. (1988, Chromatography, 430: 394-9) is used as reference method

for measuring morphine, morphine 6-glucuronide and morphine 3-glucuronide. The morphines as well as the barbiturates are determined with a commercial enzyme multiplication immunoassay (EMIT, Syva Corp., Palo Alto, USA) in accordance with the instructions for use (EMIT operator's manual, Shiva [sic] Corporation, Palo Alto, USA). It is important for evaluation of the vaccine to differentiate free drug from antibody-bound drug. The EMIT test is therefore modified as follows: the diluted serum sample is purified of antibodies before the EMIT test is performed by two-hour incubation at room temperature in a PBS buffer, pH 7.6, containing CnBr-activated Sepharose 4 B to which polyclonal rabbit antibodies to human immunoglobulin light chains are bound (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Sweden).

Five mice which had been vaccinated and five mice from the control group are injected with 0.5 mg morphine per mouse 2 weeks after the last immunisation. The serum samples are taken immediately after and 2 hours after the injection and the quantity of drug in the serum is determined using the modified EMIT test. The drug can still be detected in the samples taken just after injection of the drug, but is no longer detectable 2 hours after injection. Discrimination in the test system between positive and negative sample is set both for the barbiturates and for morphine at 5 ng/ml. Interpretation of the test results is that after successful vaccination the specific antibodies have bound themselves to the drug and the free drug is therefore no longer detectable.

Example 2:

This experiment demonstrates that "immunity" to the drug is still present even after a number of months. Two of the immunised mice from Example 1 and three mice from the control group are injected with 0.5 mg morphine two and four months after the first experiment. As in the first experiment, a blood sample is taken immediately after and 2 hours after the injection and the serum is tested for morphine in the EMIT test. The serum of the mice that were previously tested with the morphine-BSA conjugate is again negative and only the samples taken immediately after the injections show a positive result. The control group shows detectable traces of morphine in all the tests. The conclusion is drawn that the vaccine is effective for a prolonged period.

Example 3:

The purpose of this example is to show the protective effect of the specific antibodies, or the specific immunoserum containing the antibodies.

- 5 Two mice from the control group each receive 0.5 mg morphine (mouse A and B) and two each receive 0.5 mg phenobarbital (mouse C and D). Mouse A and C are each given 0.5 ml of the serum of the mice previously inoculated with the anti-morphine vaccine and mouse B and D are each given 0.5 ml of the serum of the mice previously inoculated with the anti-barbiturate vaccine. Two hours after injection of the
- 10 immunoserum, blood samples are taken and tested for the presence of drugs (modified EMIT test). The mouse which had received morphine and anti-morphine serum shows no free drug in the test. The mouse which had received morphine and anti-barbiturate serum shows free morphine in the serum. A similar phenomenon is found in the mice which received phenobarbital: free drug can no longer be detected in the mouse which
- 15 had received the specific immunoserum (mouse D). The mouse with the anti-morphine serum (mouse C) still shows traces of barbiturate in the serum.

This experiment can also be conducted with antiserum comprising monoclonal antibodies or a mixture of monoclonal antibodies to the drugs: an analogous result is

20 expected.

Claims

1. Process for the production of vaccines against drugs of abuse that can cause dependence, characterised in that one or more drugs is bound as hapten to a carrier in order to make the hapten antigenic.
2. Process for the production of vaccines against drugs of abuse that can cause dependence, characterised in that one or more drugs as hapten are chemically cross-linked in order to obtain an antigenic effect without a carrier.
3. Process according to claim 1, characterised in that the drugs of abuse that cause dependence belong to one of the following groups: opiates, marijuana, amphetamines, cocaine, barbiturates, sedatives, methaqualone, benzodiazepines, lysergic acid diethylamide, psychomimetic drugs, nicotine, anticholinergic drugs and antipsychotic drugs.
4. Process according to claim 1, characterised in that the carrier contains one or more of the following chemical components: proteins, glycoproteins, polysaccharides, liposaccharides, lipoproteins, metals.
5. Process according to claim 1, characterised in that the bond between the drug that causes dependence and the hapten is performed by a bridging substance.
6. Process according to claim 1, characterised in that an adjuvant is admixed with the vaccine to potentiate the immunogenic effect.
7. Process according to claim 1, characterised in that the vaccine is brought into a physiologically acceptable form by sterile filtration.
8. Process according to claim 1, characterised in that an aqueous solution is used, the pH of which has been adjusted with a buffer to between 5.5 and 8.
9. Process according to claim 1, characterised in that the vaccine is dialysed after binding of the hapten to the carrier in order to remove by-products of manufacture.

10. Process for the production of antibodies to drugs of abuse that can cause dependence, characterised in that the vaccine produced in the accordance with the process according to claim 1 is used as antigen for the production of antibodies to
- 5 drugs of abuse that can cause dependence.

AMENDED CLAIMS

[received by the International Bureau on 20 December 1991 (20.12.91);
original claim 10 deleted; all other claims unchanged (1 page)]

STATEMENT REFERRED TO IN ARTICLE 19

- 5 Claim 10, which describes the production of antibodies to drugs of abuse that can cause dependence, has been deleted after studying the documents considered to be relevant in the International Search Report.

The inventor is of the view that the documents considered to be relevant, which have
10 been denoted by category "X", relate solely to this claim.